

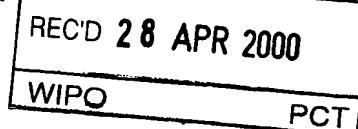
PCT/JP 00/01533

14.03.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/01533



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 3月23日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第078591号

出 願 人

Applicant (s):

寶酒造株式会社

④

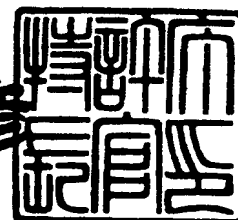
# PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3025840

【書類名】 特許願

【整理番号】 T-1374

【提出日】 平成11年 3月23日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志殿

【国際特許分類】 C12N 15/86  
C12N 5/10  
A61K 48/00

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 浅田 起代蔵

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 上野 充博

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 橋野 仁一

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代表者】 大宮 久

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063223

【納付金額】

21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】

明細書 1

【物件名】

要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤であって、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性とを有する有効量の機能性物質を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子治療剤。

【請求項 2】 遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを含有することを特徴とする請求項 1 記載の遺伝子治療剤。

【請求項 3】 ウイルスに親和性を有する機能性が、抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンー I I 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質由来である請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子治療剤。

【請求項 4】 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性が、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び代謝物から選択される機能性物質由来である請求項 1 ～ 3 いずれかに記載の遺伝子治療剤。

【請求項 5】 遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤であって、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子治療剤。

【請求項 6】 遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを含有することを特徴とする請求項 5 記載の遺伝子治療剤。

【請求項 7】 ウイルスに親和性を有する機能性物質が、抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンー I I 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質である請求項 5 又は 6 に記載の遺伝子治療剤。

【請求項 8】 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質が、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び代謝物から選択される機能性物質である請求項 5～7 いずれかに記載の遺伝子治療剤。

【請求項 9】 遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療方法において、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性とを有する有効量の機能性物質を有効成分として投与することを特徴とする遺伝子治療方法。

【請求項 10】 遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを投与することを特徴とする請求項 9 に記載の遺伝子治療方法。

【請求項 11】 ウイルスに親和性を有する機能性が抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンー II 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質由来である請求項 9 又は 10 に記載の遺伝子治療方法。

【請求項 12】 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性が、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び代謝物から選択される機能性物質由来である請求項 9～11 いずれかに記載の遺伝子治療方法。

【請求項 13】 遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療方法において、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質を有効成分として投与することを特徴とする遺伝子治療方法。

【請求項 14】 遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを投与することを特徴とする請求項 13 に記載の遺伝子治療方法。

【請求項 15】 ウイルスに親和性を有する機能性物質が抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンー II 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質である請求項 13 又は 14 に記載の遺伝子治療方法。

【請求項 16】 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質が、標的細胞

胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び代謝物から選択される機能性物質である請求項 13～15 いずれかに記載の遺伝子治療方法。

【請求項 17】 標的細胞が造血幹細胞、血液細胞、白血球、リンパ球、T 細胞、がん浸潤リンパ球細胞、B 細胞又はがん細胞である請求項 1～16 のいずれかに記載の遺伝子治療剤又は遺伝子治療方法。

【請求項 18】 遺伝子が細胞中で発現されたとき治療に十分な量として発現される治療用タンパク質である請求項 1～17 のいずれかに記載の遺伝子治療剤又は遺伝子治療方法。

【請求項 19】 タンパク質が酵素又はサイトカインである請求項 18 記載の遺伝子治療剤又は遺伝子治療方法。

【請求項 20】 ウイルスがウイルスベクターである請求項 1～19 のいずれかに記載の遺伝子治療剤又は遺伝子治療方法。

【請求項 21】 ウイルスベクターがレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター又はワクシニアウイルスベクターである請求項 1～20 のいずれかに記載の遺伝子治療剤又は遺伝子治療方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子治療を要する疾患の治療において有用で、生体内での標的細胞への選択的遺伝子導入に有用なミサイル遺伝子治療剤及びミサイル遺伝子治療方法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来技術】

遺伝子治療は、現在世界で 3000 例程実施されているが、最大の技術的問題は標的細胞、特に造血幹細胞への治療用遺伝子の導入効率が非常に低いことであった。しかし、近年フィブロネクチン断片の組換えタンパク質 CH-296（宝酒造社製：レトロネクチン）を用いることにより、遺伝子導入効率が格段に改善され、遺伝子治療が現実のものとなってきた。この組換えレトロネクチンは治療

用遺伝子を組み込んだレトロウイルスと標的細胞の両者をその分子上に結合して近接させることにより、遺伝子導入効率を大幅に上昇させることができ、これまで最も遺伝子導入が困難といわれてきヒト造血幹細胞においても約90%の効率で治療用遺伝子の導入が認められる様になった。当該レトロネクチンは、造血幹細胞と特異的に結合するペプチドと治療用遺伝子が組み込まれたレトロウイルスベクターのそれぞれが特異的に結合する2種類のペプチドがつながった1本のポリペプチドであるが、本発明者らはこれらの2つの部分を切断してそれぞれの部分をカクテルのように混合しても、元のレトロネクチン分子と同様の作用を示すことを明らかにしており、これをカクテル遺伝子導入方法と命名している（WO 97/18318号公報参照）。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上記のレトロネクチンを用いた造血幹細胞への遺伝子導入方法は、造血幹細胞への遺伝子の導入効率の向上において画期的な方法であるが、当該造血幹細胞への遺伝子導入を生体外で行い、遺伝子導入された造血幹細胞を生体に戻す方法であり、遺伝子治療において、その操作性に煩雑な面を有している。

また近年、遺伝子治療の標的細胞の多様化に対応する、標的細胞特異的遺伝子導入方法の提供が求められている。

#### 【0004】

本発明の目的は生体内での遺伝子導入による遺伝子治療に有用な治療剤を提供し、当該治療剤を使用する、生体内での標的細胞に特異的な遺伝子導入による、簡便な遺伝子治療方法を提供することにある。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤であって、遺伝子治療に有用な遺伝子を含むウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性とを有する有効量の機能性物質を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子治療剤に関する。

## 【0006】

本発明の第1の発明の治療剤としては、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを含有しても良く、当該ウイルスと当該機能性物質が親和された状態で含有されていても良い。

## 【0007】

第1の発明の治療剤において、機能性物質のウイルスに親和性を有する機能性についての限定はないが、その機能性が抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンーII結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質由来である機能性物質が例示される。

## 【0008】

また、第1の発明の治療剤において、機能性物質の標的細胞に特異的な親和性を有する機能性についての限定は無いが、その機能性が標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び代謝物から選択される機能性物質由来である機能性物質が例示される。

## 【0009】

本発明の第2の発明は、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤であって、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子治療剤に関する。

## 【0010】

本発明の第2の発明の治療剤としては、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを含有しても良く、当該ウイルスとウイルスに親和性を有する機能性物質が親和された状態で含有されていても良い。

## 【0011】

本発明の第2の発明の治療剤において、ウイルスに親和性を有する機能性物質に特に限定はないが、抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンーII結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同



等物から選択される機能性物質が例示される。

【0012】

また、本発明の第2の発明の治療剤において、標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質に特に限定はないが、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び代謝物から選択される機能性物質が例示される。

【0013】

本発明の第3の発明は、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療方法において、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性とを有する有効量の機能性物質を有効成分として投与することを特徴とする遺伝子治療方法に関する。

【0014】

本発明の第3の発明の遺伝子治療方法においては、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを投与すれば良く、当該ウイルスを本発明の治療剤と同時に投与しても良く、また時間において投与しても良い。

【0015】

本発明の第3の発明の遺伝子治療方法において、機能性物質のウイルスに親和性を有する機能性についての限定はないが、その機能性が抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリン-Ⅱ結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質由来である機能性物質が例示される。

【0016】

また、本発明の第3の発明の遺伝子治療方法において、機能性物質の標的細胞に特異的な親和性を有する機能性に限定はないが、その機能性が標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び代謝物から選択される機能性物質由来である機能性物質が例示される。

【0017】

本発明の第4の発明は、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療方法において、

遺伝子治療に有用な遺伝子を含むウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質を有効成分として投与することを特徴とする遺伝子治療方法に関する。

## 【0018】

本発明の第4の発明においては、遺伝子治療に有用な遺伝子を含む有効量のウイルスを投与すれば良く、当該ウイルスを本発明の治療剤と同時に投与しても良く、また時間をおいて投与しても良い。

## 【0019】

本発明の第4の発明の遺伝子治療方法において、ウイルスに親和性を有する機能性物質に限定はないが、抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンーII結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質が例示される。

## 【0020】

また本発明の第4の遺伝子療法において、標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質に限定はないが、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び代謝物から選択される機能性物質が例示される。

## 【0021】

本発明の第1又は第2の発明の治療剤、又は第3又は第4の発明の遺伝子治療方法において、遺伝子導入の標的細胞に特に限定はないが、標的細胞としては、造血幹細胞、血液細胞、白血球、リンパ球、T細胞、がん浸潤リンパ球、B細胞又はがん細胞が例示される。

## 【0022】

本発明の第1又は第2の発明の治療剤、又は第3又は第4の発明の遺伝子治療方法において、標的細胞に遺伝子導入される遺伝子は、遺伝子治療の目的で使用され得る遺伝子で有れば良く、特に限定はないが、当該遺伝子が細胞中で発現されたとき治療に十分な量として発現される治療用タンパク質であれば良く、当該タンパク質としては、生体内酵素又はサイトカインが例示される。

## 【0023】

本発明の第1又は第2の発明の治療剤、又は第3又は第4の発明の遺伝子治療方法において、使用され得るウイルスとしては、臨床において治療手段として使用されうるウイルスであれば特に限定はなく、安全性の確認されたウイルスベクターを使用することができる。当該ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター又はワクシニアウイルスベクター等が例示され、標的細胞への感染性、遺伝子導入効率より選択すればよい。

## 【0024】

本発明者らは、標的細胞に親和性を有する機能性とウイルスに親和性を有する機能性とを利用することにより、生体内で遺伝子導入を行う標的細胞を自由に選択でき、当該標的細胞にウイルスを利用した遺伝子導入が効率よく行われ、従来困難であった生体内での遺伝子導入のターゲッティング、すなわちミサイル遺伝子療法が可能となることを見出し本発明を完成した。

## 【0025】

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の治療剤を用いるミサイル遺伝子療法において使用されるウイルスベクターは特に限定はないが、通常、組換えレトロウイルスベクターが使用され、特に複製能欠損組換えレトロウイルスベクターが好適である。該ベクターは感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させてあり、非病原性である。これらのベクターは脊椎動物、特に哺乳類動物のような宿主細胞に侵入し、その染色体DNA中にベクターに挿入された遺伝子治療に有用な外来遺伝子を安定に組み込むことができる。

## 【0026】

本発明では、生体内で標的細胞に遺伝子導入される遺伝子は、適当なプロモーター、例えば、ウイルスベクター中に存在するプロモーターや外来プロモーターの制御下に、組換えレトロウイルスベクター内に挿入して使用することができる。また、効率よい遺伝子の転写を達成するために、プロモーターや転写開始部位

と共同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列やターミネーター配列がベクター内に存在していてもよい。導入される遺伝子は天然のものでも、または人工的に作製されたものでもよく、あるいは起源を異にするDNA分子が、ライゲーション等の公知の手段によって結合されたものであってもよい。

#### 【0027】

ウイルスベクターに挿入される遺伝子は、生体内で標的細胞中に導入することが望まれる任意の遺伝子を選ぶことができる。この様な遺伝子としては、例えば、治療の対象となる疾患に関連している酵素やタンパク質をコードするものの他、細胞内抗体(例えば、WO94/02610号参照)、増殖因子、アンチセンス核酸、リボザイム、フォルスプライマー(例えば、WO90/13641号参照)等をコードするものを使用することができる。

#### 【0028】

本発明に使用されるウイルスに親和性を有する機能性物質としては、特に限定はなく、例えば、抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンーII結合領域、線維芽細胞増殖因子、V型コラーゲン、ポリリジン等があり、またこれらの機能性物質と機能的に同等な物質、例えば、ヘパリン結合性部位を有する機能性物質も使用することができる。またこれらの機能性物質由来であっても良い。なお本発明において由来とは使用する機能性物質分子中に、ウイルスに親和性を有する機能性物質の機能性部位が包含されているものを言う。また親和性(アフィニティー)とはウイルスとの結合性、細胞との接着性を含む概念である。本発明に使用する機能性物質のウイルスへの親和性により、特定の細胞よりなる臓器、器官、また細胞へのウイルスのターゲッティングが可能になり、特定の細胞への生体内での遺伝子導入による、遺伝子治療が可能となる。

#### 【0029】

ウイルスに特異的に親和性を有する抗体は、特定の標的細胞に特異的に、かつ高い効率で遺伝子を導入するうえで特に有用である。本発明に使用できる抗体としては特に限定はなく、遺伝子を導入用のウイルスで発現されている抗原に対する抗体を適宜選択し、使用することができる。該抗体は公知の方法によって作製することができるが、現在では多くの抗体が市販されており、これらを使用する

こともできる。これらの抗体は、細胞特異性等所望の性質を有しているものであれば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のどちらでもよい。さらに、公知技術により修飾された抗体や抗体の誘導体、例えば、ヒト化抗体、F a b フラグメント、一本鎖抗体等を使用することもできる。

#### 【0030】

また、本発明に使用される標的細胞に親和性を有する機能性物質も、特に限定はないが、例えば、細胞親和性のタンパク質、ホルモンやサイトカイン、細胞表面の抗原に対する抗体、多糖類、糖タンパク質、糖脂質、糖タンパク質や糖脂質由来の糖鎖、あるいは標的細胞の代謝物などが挙げられる。またこれらの機能性物質由来であっても良い。当該機能性物質由来とは使用する機能性物質分子中に、標的細胞に親和性を有する機能性物質の機能性部位が包含されているものを言う。また標的細胞への親和性とは標的細胞との結合性、細胞との接着性を含む概念である。本発明に使用する機能性物質の標的細胞への親和性により、特定の細胞よりなる臓器、器官、また細胞へのウイルスのターゲッティングが可能になり、特定の細胞への生体内での遺伝子導入による、遺伝子治療が可能となる。

#### 【0031】

標的細胞に特異的に結合する抗体は、特定の標的細胞に高い効率で遺伝子を導入するうえで特に有用である。本発明に使用できる抗標的細胞体としては特に限定はなく、遺伝子を導入しようとする標的細胞で発現されている抗原に対する抗体を適宜選択し、使用することができる。該抗体は公知の方法によって作製することができるが、現在では多くの抗体が市販されており、これらを使用することもできる。これらの抗体は、細胞特異性等所望の性質を有しているものであればモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のどちらでもよい。さらに、公知技術により修飾された抗体や抗体の誘導体、例えば、ヒト化抗体、F a b フラグメント、一本鎖抗体等を使用することもできる。

#### 【0032】

C D 抗原として知られている白血球抗原は、各抗原について種々の細胞における発現が詳細に調べられている。したがって、目的の標的細胞に発現しているC D 抗原を認識する抗体を選び、これを本発明の遺伝子導入方法に用いることによ

り、標的細胞に高い特異性で遺伝子を導入することができる。例えば、抗CD4抗体を使用した場合にはヘルパーT細胞に、また抗CD34抗体を使用した場合には造血幹細胞に、それぞれ遺伝子導入を方向づけることができる。

#### 【0033】

また、標的細胞親和性を有する機能性物質として糖タンパク質であるラミニンを使用することにより、種々の標的細胞、例えば、血液系の細胞に効率よく遺伝子を導入することができる。本発明に使用できるラミニンは、標的細胞に対する結合活性を有していれば、そのフラグメントであってもよい。また、ラミニンを使用した遺伝子導入では、その糖鎖が重要な役割を果たしている。従って、ラミニンより公知の方法で切り出した糖鎖も使用することができる。また、ラミニンと同様の高マンノース型のN-結合型糖鎖を有する糖タンパク質や、これより切り出した糖鎖、さらに化学的に合成した該糖鎖を本発明に使用することもできる。さらに、上記の糖鎖をタンパク等の物質に結合させたものを使用することもでき、例えば、レトロウイルスに親和性を有する機能性物質に結合させたものは遺伝子導入に好適に使用できる。

#### 【0034】

上記のような機能性物質は天然起源の物質から得ることができ、また、人為的に作製する（例えば、組換えDNA技術や化学合成技術によって作製する）ことができ、さらに、天然起源の物質と人為的に作製された物質との組合せにより作製することもできる。

#### 【0035】

本発明の方法に使用されるフィブロネクチンやそのフラグメントは、例えば、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biol. Chem.) 第256巻、第7277頁 (1981年)、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (J. Cell. Biol.)、第102巻、第449頁 (1986年)、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、第105巻、第489頁 (1987年) に記載の方法によって、天然起源の材料から実質的に純粋な形態で製造することができる。また、米国特許第5,198,423号に記載の方法により、組換えDNA技術を利用製造することもできる。特に、レトロウイルス結合部位であるヘパリンーII領域を含むフィ

ブロネクチンフラグメント、例えば、前出のCH-296（レトロネクチン）、およびH-271、H-296、CH-271等の組換えポリペプチド、ならびにこれらを取得する方法はこの特許に詳細に記載されている。これらのフラグメントは上記公報に記載されているように、茨城県つくば市東1丁目1番3号の通産省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-10721（H-296）（原寄託日：平成1年5月12日）、FERM BP-2799（CH-271）（原寄託日：平成1年5月12日）、FERM BP-2800（CH-296）（原寄託日：平成1年5月12日）およびFERM BP-2264（H-271）（原寄託日：平成1年1月30日）の受託番号のもとで寄託された大腸菌を培養することによって入手することができる。また、これらのフラグメントから定型的に誘導できるフラグメントは上記の大腸菌に保持されているプラスミドを公知の遺伝子組換え手法で改変することにより、作製することができる。

## 【0036】

本発明に使用する機能性物質の例としては、標的細胞に特異的な親和性を有する抗標的細胞抗体とウイルスに特異的な親和性を有する抗ウイルス抗体よりなる機能性物質、標的細胞細胞に特異的な親和性を有する糖鎖とウイルスに特異的に親和性を有する抗ウイルス抗体よりなる機能性物質が例示され、これらの機能性物質を使用することによって、種々の細胞が混在する生体内において、特定の細胞だけを狙った遺伝子導入が可能となる。特に、糖鎖は、細胞の顔といわれているように、細胞の多様な性質を決定し、細胞は相互に多彩な糖鎖を通じて認識し相互作用している。従ってこの糖鎖の特異性を利用する、遺伝子導入のターゲティングは、抗体の特異的結合力と合わせ、生体内における最も高精度なミサイル遺伝子療法を可能にする。

## 【0037】

遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性を有する有効量の機能性物質を有効成分として、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤を製造することができる。また、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とす

る標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質を有効成分として、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤を製造することができる。

## 【0038】

本発明の治療剤としては、上記のそれぞれの有効量の機能性物質を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せて製剤化すればよい。当該治療剤は注射剤、点滴用剤として投与することができる。

## 【0039】

治療剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り $10\mu\text{g} \sim 200\text{mg/kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。

## 【0040】

本発明の有効量の治療剤を有効成分として投与することにより、本発明の遺伝子治療方法が提供される。

## 【0041】

本発明の遺伝子治療方法においては、ウイルス親和性を有する機能性物質に、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを結合させた状態で投与しても良く、また生体内で当該ウイルスが当該ウイルス親和性を有する機能性物質に親和するように投与しても良い。いずれにしても生体内で標的細胞への遺伝子導入が効率よく行われるように設定すれば良い。

## 【0042】

本発明により、遺伝子導入の標的となる細胞も特に制限はなく、例えば、幹細胞 (stem cells)、造血細胞、非接着性低密度単核細胞、接着性細胞、骨髓細胞、造血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血液細胞、胎児性造血幹細胞、胚形成幹細胞、胚細胞、プライモディアル・ジャーム・セル (primordial germ cell)、卵母細胞、卵原細胞、卵子、精母細胞、精子、CD34+細胞、C-kit+細胞、多能性造血前駆細胞、単能性造血前駆細胞、赤血球系前駆細胞、リンパ球母細胞



、成熟血球、血液細胞、白血球、リンパ球、B細胞、T細胞、がん浸潤リンパ球、線維芽細胞、神経芽細胞、神経細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、肝細胞、筋芽細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、ガン細胞、骨髓腫細胞及び白血病細胞等が例示される。

#### 【0043】

造血幹細胞を標的とした遺伝子治療としては、患者において欠損しているか、異常が見られる遺伝子を補完するものがあり、例えば、ADA（アデノシン デアミダーゼ）欠損症（米国特許番号5399346号公報参照）やゴーシェ病の遺伝子治療がこれにあたる。この他、例えば、ガンや白血病の治療に使用される化学療法剤による造血細胞の障害を緩和するために、造血幹細胞への薬剤耐性遺伝子の導入が行われることがある。

#### 【0044】

また、がんの遺伝子治療法としては、がん細胞にサイトカイン類の遺伝子を導入した後にその増殖能力を奪って患者の体内に戻し、腫瘍免疫を増強させる腫瘍ワクチン療法が研究されている【ヒューマン・ジーン・セラピー、第5巻、第153～164頁（1994年）】。さらに、AIDSを遺伝子治療法によって治療しようという試みも行われている。この場合には、AIDSの原因であるHIV（ヒト免疫不全ウイルス）の感染するT細胞に、HIVの複製や遺伝子発現を妨げるような核酸分子（アンチセンス核酸やリボザイム等）をコードする遺伝子を導入することが考えられている【例えば、ジャーナル・オブ・ウィロロジー、第69巻、第4045～4052頁（1995年）】。

#### 【0045】

以上に詳細に説明したように、本発明の治療剤、治療方法により生体内での標的細胞への特異的な遺伝子導入により、遺伝子治療を要する疾病の治療が可能となる。なお、本発明の治療剤を生体内に投与してもその生理的有效濃度の範囲において急性毒性は認められない。

#### 【0046】

##### 【実施例】

以下に実施例を挙げて、さらに詳しく本発明を説明するが、本発明は下記実施

例の範囲のみに限定されるものではない。

【0047】

実施例 1

(1) 8週令のC3H/HeJマウスに、EPHA-5産生細胞によって産生されたヒトADA遺伝子(hADA)を含有するPGKベクターであるPGK-hADAベクター、及び実施例2に記載のレトロネクチン注射剤を尾静脈中に注射した。造血幹細胞への形質導入は、ネイチャー メディシン、第2巻、第876～882頁(1996)に従い、遺伝子導入マウスにおける形質導入されたヒトADA cDNAの発現を試験することにより分析した。すなわち、マウス末梢血細胞中のヒトADAタンパク質の存在を酢酸セルロース電気泳動により検出するADAアイソザイム分析により確認した。試験は、移植後4ヶ月の初めに実施し、そして毎月繰り返した。

【0048】

(2) アイソザイム分析による9ヶ月後の形質導入骨髓の被移植体の分析によってレトロネクチンとPGK-hADAベクターを投与したマウスにおいて、ヒトADA cDNAの発現を確認した。なお対照のマウスではヒトADAは検出されなかった。

【0049】

実施例 2

レトロネクチン(宝酒造社製)を2mg/mlとなるように注射用水に溶解した後、生理食塩水で平衡化し、注射剤を作成した。

【0050】

【発明の効果】

本発明により生体内において、標的細胞への遺伝子導入のターゲッティングが可能で、目的の標的細胞に特異的に遺伝子導入を行い、その結果、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に有用な治療及び当該治療剤が提供される。またこの治療剤を投与することによる遺伝子治療方法が提供され、生体内での標的細胞への遺伝子導入による遺伝子治療方法を提供する。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

生体内で標的細胞に目的遺伝子を導入する遺伝子治療技術の提供。

【解決手段】

ウイルスに親和性を有する機能性と標的細胞に親和性を有する機能性とを有する機能性物質、もしくはウイルスに親和性を有する機能性物質と標的細胞に親和性を有する他の機能性物質とを有効成分として含有することを特徴とする、遺伝子治療に感受性を示す疾患に使用する遺伝子治療剤。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

氏 名 寶酒造株式会社